



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: TAMOTSU KONDOW ET AL

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HEREWITH

FOR: METHODS FOR DETERMINING NUCLEOTIDE SEQUENCES OF SINGLE NUCLEIC ACID MOLECULES

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☒ Full benefit of the filing date of International Application Number PCT/JP01/02806, filed March 30, 2001, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	2000/094727	MARCH 30, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

William E. Beaumont
Registration No. 30,996



22850

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 3月30日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-094727

出 願 人
Applicant(s):

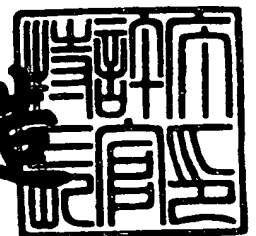
トヨタ自動車株式会社
株式会社コンボン研究所

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2001年10月 3日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



【書類名】 特許願

【整理番号】 P99-0412

【提出日】 平成12年 3月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68
G01N 33/58

【発明の名称】 単一核酸分子の塩基配列決定法

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江東区越中島1-3-1-1002A

 【氏名】 近藤 保

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江東区東雲2-7-5-1905

 【氏名】 真船 文隆

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県浦安市今川3-6-5 ビッグファーム101号
 室

 【氏名】 武田 佳宏

【特許出願人】

 【識別番号】 000003207

 【氏名又は名称】 トヨタ自動車株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 598014814

 【氏名又は名称】 株式会社コンボン研究所

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 単一核酸分子の塩基配列決定法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単一色素分子検出によって核酸の塩基配列を決定する方法であって、

- (1) 固体表面に核酸分子を固定するステップ、
 - (2) 該核酸分子に、その配列の一部分と相補的な配列を有するプライマーをアニーリングさせるステップ、
 - (3) DNAポリメラーゼと1種類の色素標識dNTP (N=A, TもしくはU, GまたはC)、あるいはRNAポリメラーゼと1種類の色素標識NTP (N=A, U, GまたはC)、を含む液滴を該固定された核酸分子に提供して、該プライマーの3'末端にヌクレオチドを反応させ、このとき該ポリメラーゼは反応部位と向かい合う塩基と塩基対を組むヌクレオチドを取り込むステップ、
 - (4) 結合した色素標識dNTPまたはNTPの存在を検出するステップ、
 - (5) 該結合した色素標識dNTPまたはNTPの色素分子を破壊するステップ、
 - (6) 色素標識dNTPまたはNTPの種類を順次変えて上記ステップ(3)から(5)を繰り返し、該核酸分子のヌクレオチドと塩基対を形成するdNTPまたはNTPを順次結合させるステップ、
 - (7) 該結合されたdNTPまたはNTPの種類に基づいて該核酸分子の塩基配列を決定するステップ
- を含む、上記方法。

【請求項2】 前記固体表面がキャピラリーの内壁である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記ステップ(4)において、前記色素標識dNTPまたはNTPの色素分子を光学的に検出することからなる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記ステップ(4)において、色素分子をレーザー光線の照射によって励起し、これによって放出された蛍光シグナルを検出することからなる、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】 前記検出が共焦点蛍光顕微鏡システムを用いて行なわれる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 前記ステップ (5) における色素分子の破壊が、ステップ (4) におけるものより強いレーザー光線の照射によって行なわれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 前記色素が蛍光色素である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 前記液滴が、前記色素標識 d N T P または N T P を含有する水溶液を疎水性液体の内部に含むものからなる、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、単一分子検出によって単一核酸分子の塩基配列を決定する方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

DNA の塩基配列決定法として日常的に使用されている方法は Sanger 法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463, 1977) である。この方法はジデオキシ鎖終止法とも称され、DNA 試料の 5' 末端にプライマーをアニーリングさせた後、DNA ポリメラーゼと 4 種類のデオキシヌクレオシド三リン酸 d N T P (N は A, C, T および G である。) および各 2', 3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸 d d N T P (N は A, C, T または G である。) の存在下に相補鎖合成を行い、d d N T P が取り込まれた位置で伸長反応を停止させ、得られた反応産物をゲル電気泳動にかけて DNA 試料の塩基配列を決定する方法である。このとき形成される DNA 断片は一般に放射性標識され、これによって断片の位置が識別可能となる。

【0 0 0 3】

さらにまた、放射性標識を用いる場合には特別の施設が必要となるため、これに代わる標識として蛍光標識を用い、レーザー光線の照射により蛍光を検出する塩基配列決定法も開発されている (例えば特許第 2901004 号公報、特公平 7-4334

7号公報など)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかしSanger法を利用する場合、配列決定しようとするDNAを予めM13などのベクターに組み込んで大量に複製する必要があること、電気泳動1レーンあたり検出可能な塩基数は最大1000bpに制限されることなどの問題点がある。このため、DNAの塩基配列を5'末端から1塩基ずつ直接識別することにより該配列を決定することができ、且つDNAの多数の複製分子を必要とせずに単離された単一DNA分子を直接配列決定に使用することができるならば、配列決定の効率が著しく向上されると考えられる。

【0005】

したがって、本発明の目的は、単一分子検出によって単一核酸分子の塩基配列を決定する方法を提供することである。この方法では、核酸の塩基を一分子ずつ検出することが可能であるとともに、細胞内のDNAもしくはRNA分子を直接解読できるという利点が提供される。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明を以下に要約する。

本発明は、単一色素分子検出によって核酸の塩基配列を決定する方法であって

- (1) 固体表面に核酸分子を固定するステップ、
- (2) 該核酸分子に、その配列の一部分と相補的な配列を有するプライマーをアニーリングさせるステップ、
- (3) DNAポリメラーゼと1種類の色素標識dNTP (N=A, TもしくはU, GまたはC)、あるいはRNAポリメラーゼと1種類の色素標識NTP (N=A, U, GまたはC)、を含む液滴を該固定された核酸分子に提供して、該プライマーの3'末端にヌクレオチドを反応させ、このとき該ポリメラーゼは反応部位と向かい合う塩基と塩基対を組むヌクレオチドを取り込むステップ、
- (4) 結合した色素標識dNTPまたはNTPの存在を検出するステップ、

(5) 該結合した色素標識 d N T P または N T P の色素分子を破壊するステップ

(6) 該色素標識 d N T P または N T P の種類を順次変えて上記ステップ (3) から (5) を繰り返し、該核酸分子のヌクレオチドと相補する d N T P または N T P を順次結合させるステップ、

(7) 該結合された d N T P または N T P の種類に基づいて該核酸分子の塩基配列を決定するステップ
を含む方法を提供する。

【0007】

本発明の実施態様において、上記ステップ (1) の固体表面はキャピラリーの内壁である。

また本発明の別の実施態様において、上記ステップ (4) の検出は上記色素標識 d N T P または N T P の色素分子を光学的に検出することからなる。さらに具体的には、検出は、該色素分子をレーザー光線の照射によって励起し、これによって放出された蛍光シグナルを検出することによって行うことができる。このような検出方法として、例えば共焦点蛍光顕微鏡システムを用いる方法を挙げることができる。

【0008】

本発明のさらに別の実施態様において、上記ステップ (5) における色素分子の破壊はステップ (4) におけるものより強いレーザー光線の照射によって行われる。

本発明のさらに別の実施態様において、上記色素は蛍光色素である。

本発明のさらに別の実施態様において、上記液滴は、色素標識 d N T P または N T P を含有する水溶液を疎水性液体の内部に含むものからなる。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明は、単一分子検出法を用いることによってDNAまたはRNAからなる核酸分子の塩基配列を決定する方法を提供する。ここで単一分子検出法とは、任意の単一分子を任意の分析法で検出する方法を意味する。本発明においては、色素標識

されたデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP、ここでNはA,TもしくはU,GまたはCである。）またはヌクレオシド三リン酸（NTP、ここでNはA,U,GまたはCである。）の色素分子は、通常、分光学的装置を用いて光学的に検出することができ、後述の実施例では該検出は共焦点蛍光顕微鏡システムによって行なわれる（図2参照）。

【0010】

以下においては、図1を参照しながら本発明を説明する。

本発明方法では、その第1ステップにおいて固体表面に核酸分子を固定する。

核酸分子は、核酸試料を通常の方法で精製し、アルカリ処理により変性して一本鎖分子とした後に、固体表面に固定されうる。

【0011】

固体表面は核酸分子が固定されうるものであればいかなる材質のものでもよく、例えばそのような材質としてガラスや樹脂を挙げることができる。また固体表面の形状は平面、曲面等のいずれの形状でもよい。固体表面として、例えばキャピラリー（例えばガラスや樹脂製）の内壁を使用することができる。キャピラリーは、キャピラリーの内部に核酸分子を固定したあと、その内部に色素標識dNTPまたはNTPとポリメラーゼ酵素を含む液滴を自動的に送り込むのに適している。キャピラリーの内径は、液滴が通過し得るサイズ、例えば100 μ mであり、また長さは通常約10 mmで十分であるが、内径および長さはこれらに限定されないものとする。

【0012】

固体表面は、配列決定すべき核酸分子が固定され易いように、また未反応の色素標識dNTPまたはNTP分子が付着しないような処理をしておくことが望ましい。例えば、固体表面にアビジンを結合しておくことが考えられる。この場合、核酸分子にビオチンを結合することによって、固体表面に核酸分子を優先的に固定することが可能である。核酸分子を固体表面に固定するときには、1分子の核酸を固定するのが望ましいが、実際には複数の核酸分子が表面に固定される。実際の測定においては、希釈された核酸分子を固体表面に固定し、固定された核酸分子1個を視野に入れて配列決定を行う。

【0013】

第2のステップでは、核酸分子に、その配列の一部分と相補的な配列を有するプライマーをアニーリングさせる。

プライマーとして、通常ランダムプライマーを使用することができる。あるいは、配列決定されるべき核酸分子の配列の一部、通常その5'末端側の配列が判明している場合には、その配列に基づいてプライマーを作製し使用することができる。プライマーは核酸分子にアニーリング可能であれば、そのサイズは特に制限されないが、通常約15ヌクレオチドである。

【0014】

第3のステップでは、DNAポリメラーゼと1種類の色素標識dNTP (N=A, TもしくはU, GまたはC)、あるいはRNAポリメラーゼと1種類の色素標識NTP (N=A, U, GまたはC)、を含む液滴を該固定された核酸分子に提供して、上記プライマーの3'末端にヌクレオチドを反応させる。このとき該ポリメラーゼは反応部位と向かい合う塩基と塩基対を組むヌクレオチドを取り込む。

ここで「1種類の」とは、4種類の色素標識dNTPまたはNTPのうちの特定の1つを意味する。その種類が特定されていることによって、プライマーに実際に結合するdNTPまたはNTPの種類が分かる。

【0015】

図1では、核酸分子を固定したキャピラリーセル中に溶媒を流し、その流れに乗せてDNAポリメラーゼと色素標識塩基dATPを1種類だけ含む微小液滴を導入し、すでに標的DNAに結合しているDNA配列ATGの次の塩基の反応を起こさせる。このときDNAポリメラーゼによる塩基の取り込み反応が起こらなければ、未反応の塩基は洗い流されるので、単一分子検出によりDNA上に色素は検出されない。その時は、別の種類の塩基(dGTP、dCTPまたはdTTP)を含む微小液滴に対して同様の操作を行う。この操作を、塩基が上記DNA配列に取り込まれ、DNA上に色素が検出されるまで繰り返す。図では、プライマーの3'側に結合したATGという配列まで分かった標的のDNAに対して、dTTPを含む液滴を作用させたときに色素を検出すればATGの次はTであることが分かる。同じ塩基が連続して並んでいるD

NA試料の場合、ある液滴を作用させたとき複数の塩基がDNA配列に取り込まれることも考えられるが、このような場合には色素の個数を例えば蛍光強度によって識別することによって何個の連続した塩基が取り込まれたかを検出することができる。

【0016】

本発明においては、DNAポリメラーゼと1種類の色素標識dNTP（ここでN=A,TもしくはU,GまたはC）、またはRNAポリメラーゼと1種類の色素標識NTP（ここでN=A,U,GまたはC）、を含有する液滴は、該色素標識dNTPまたはNTPを含有する水溶液をミネラルオイル（鉱油）等の疎水性液体の内部に封入することによって調製できる。このような液滴は例えばマイクロインジェクターを使って容易に調製することができる。液滴のサイズは、通常、直径約10~25 μ mであり、数百fLの体積である。

キャピラリーセルに流す溶媒としては、液滴と非親和性である溶媒、例えばLight white oil (d=0.84g/ml;一般市販名称ミネラルオイル)が使用できる。

【0017】

dNTPまたはNTPを標識するための色素としては、蛍光体または発光体、例えばローダミンまたはフルオレセイン、例えばテトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC、発光波長573nm)、ローダミン6G (発光波長550nm)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC、発光波長515nm) を使用することができる。その他、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラゾン (NBD-F、発光波長540nm)、テキサスレッド (発光波長605nm) など使用可能である。本発明の方法では、色素は塩基すなわちdNTPまたはNTPの種類に関係なく同一であってもよいし、あるいは塩基の種類に応じて異なってもよい。操作を簡便化するためには、同一の色素でdNTPまたはNTPを標識するのが好ましい。dNTPまたはNTPに色素を結合する方法としては市販品を使用してもよいし、あるいは文献（例えばJ. Histochem. Cytochem. 44(5):525-529 (1996)）に記載される方法に従って合成してもよい。

【0018】

第4のステップでは、結合した色素標識dNTPまたはNTPの存在を検出す

る。

結合された色素標識 d NTP または NTP の検出は、図 2 に示すように、例えば共焦点蛍光顕微鏡システムを用いて該核酸分子にレーザー光線を照射し、励起された色素分子が出す蛍光シグナルを検出器に導いて光子数を計数することによって蛍光シグナルを検出することにより行なわれる。

【 0 0 1 9 】

図 2 においては、アルゴンイオンレーザーの励起光 (488nm) をダイクロイックミラーで反射させ、対物レンズを通して DNA 試料に焦点を結ぶようにし、この励起光で励起された色素分子が出す蛍光シグナルをバンドパスフィルターを通して共焦点用のピンホール (直径 50 μ m) に導き、検出器 (例えばアバランシェフォトダイオード) に入ってきた光子数をマルチチャンネルカウンタで数え、これによって蛍光シグナルを検出する。バンドパスフィルターを介在させることにより蛍光シグナルを選択的に取り出すことが可能となる。またピンホールを介在させることにより不要な光が除去される。

【 0 0 2 0 】

第 5 のステップでは、結合した色素標識 d NTP または NTP の色素分子を破壊する。

本発明によれば、核酸分子上で色素標識 d NTP または NTP を反応させ色素分子が検出された後で次の色素標識 d NTP または NTP が結合する前に、検出を終えた色素分子を破壊する必要がある。このための手段として、例えばステップ (4) におけるものより強いレーザー光線 (通常、約 10 mW) を照射する方法が使用できる。

【 0 0 2 1 】

第 6 のステップでは、色素標識 d NTP または NTP の種類を順次変えて上記ステップ (3) から (5) を繰り返し、該核酸分子のヌクレオチドと塩基対を形成する d NTP または NTP を順次結合させる。

ここで「色素標識 d NTP または NTP の種類を順次変えて」とは、4 種類の色素標識 d NTP または NTP のうち特定の塩基を核酸分子に送り込み、結合が起こらない場合には別の特定の塩基を送り込み、それでも結合が起こらない場合

にはさらに別の特定の塩基を送り込み、というように、結合が起こるまで塩基の種類を変えることを意味する。塩基の結合が起こったか否かをステップ（４）で確認し、結合した塩基の色素分子の破壊をステップ（５）で行う。このステップ（３）から（５）の操作を核酸分子の塩基数（最大）分だけ順次繰り返す行う。

【0022】

第7のステップでは、結合されたdNTPまたはNTPの種類に基づいて核酸分子の塩基配列を決定する。

上で説明した本発明の方法によって、プライマー配列に結合されたA-T-G-Cからなる配列を、ローダミン6Gで標識されたdNTP (N=A,T,G,C)と市販のDNAポリメラーゼを含む液滴を用いて決定することが可能であった。

【0023】

【発明の効果】

本発明により核酸の塩基配列を一塩基ずつ検出し解読することが可能となった。またこれにより、配列決定のスピードが約2桁向上すると共に、一本鎖の核酸分子を多数複製することなしに直接配列決定にかけることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

この図は、本発明の単一色素分子検出によりDNAの塩基配列を決定する方法を模式的に示したものである。

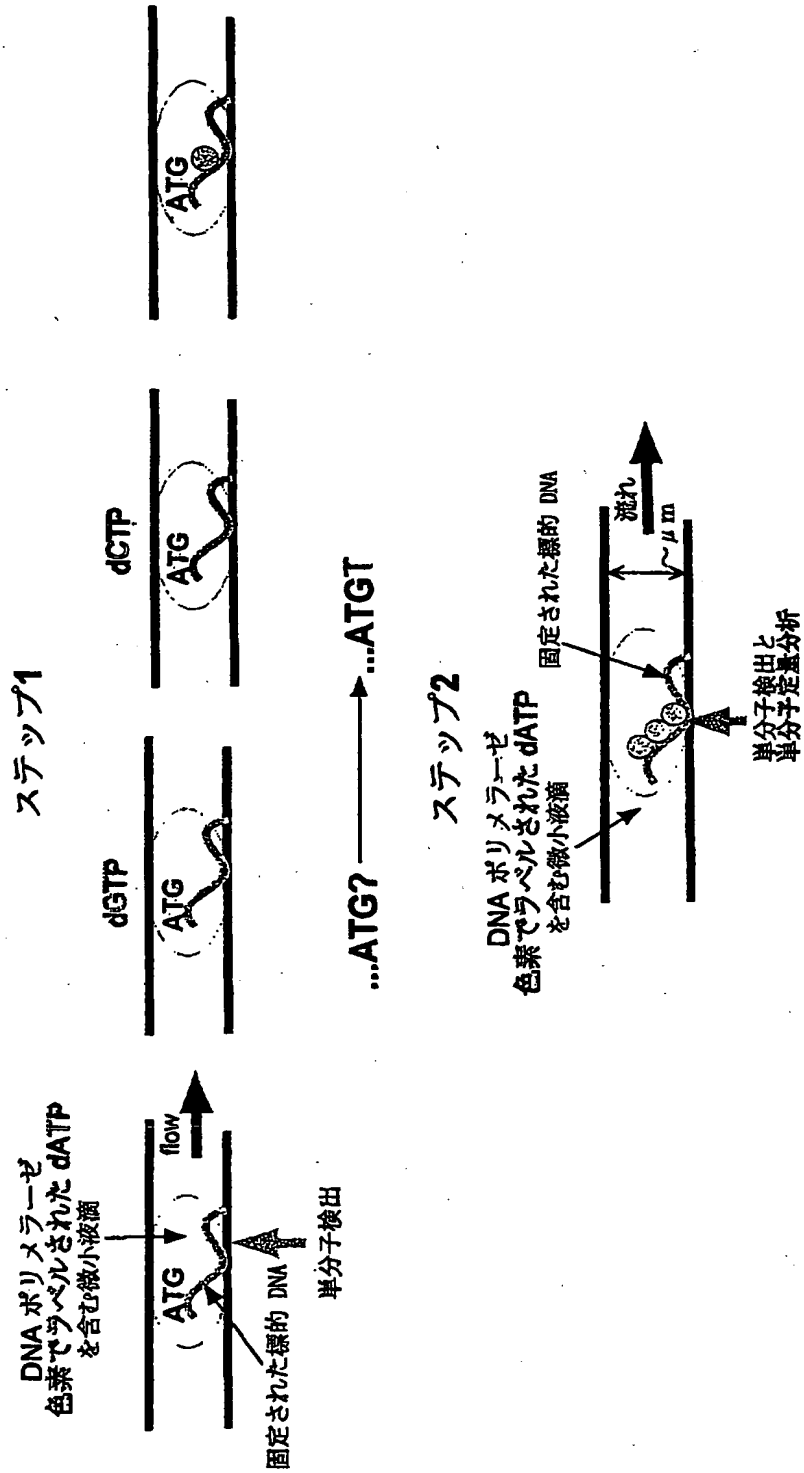
【図2】

この図は、共焦点蛍光顕微鏡システムを用いて色素分子由来の蛍光シグナルを検出する仕方を模式的に示したものである。

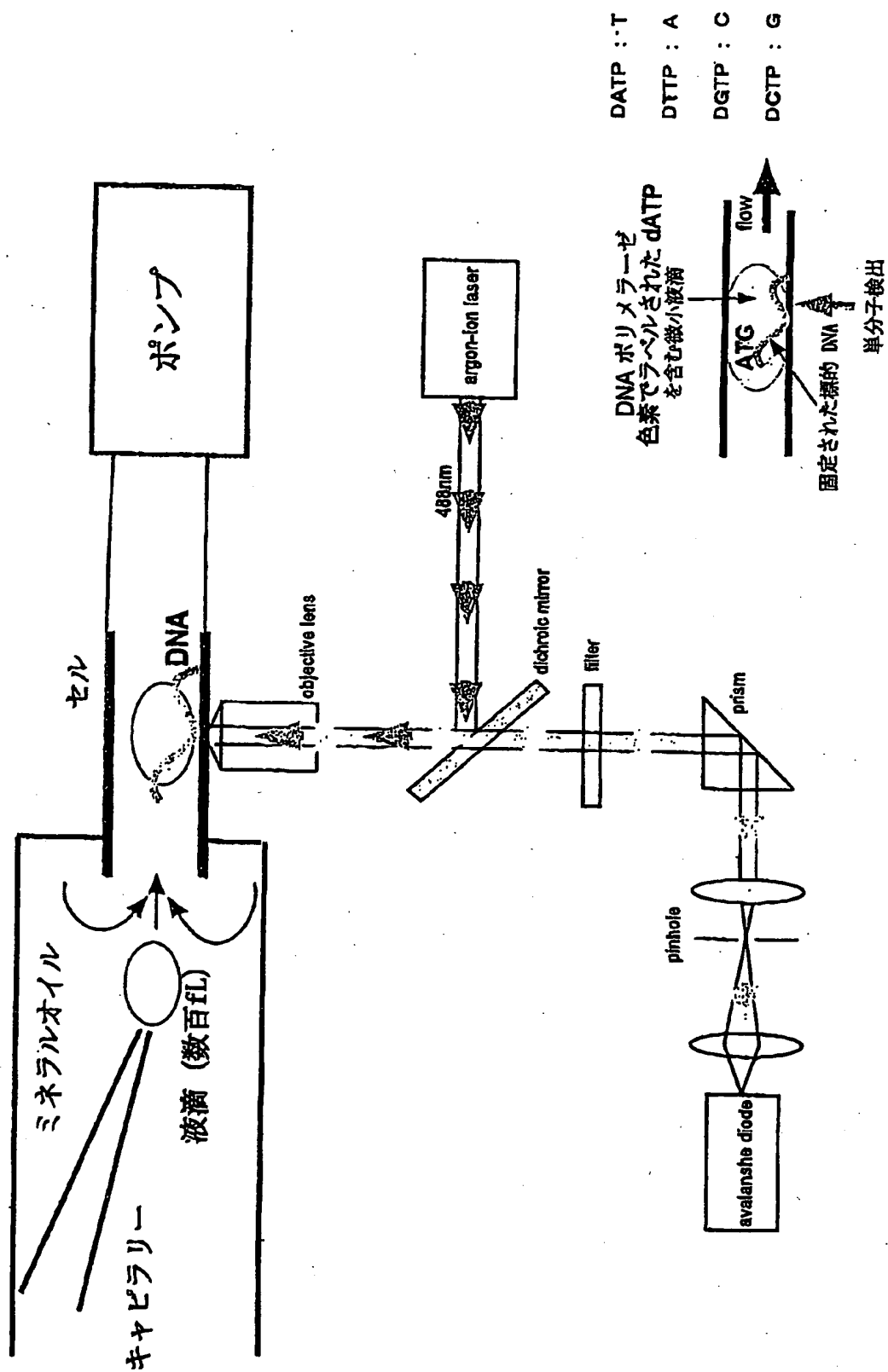
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 単一分子検出によって核酸の塩基配列を決定する方法を提供する。

【解決手段】 単一色素分子検出によって核酸の塩基配列を決定する方法であって、(1) 固体表面に核酸分子を固定し、(2) 該核酸分子に、その配列の一部と相補的な配列を有するプライマーをアニーリングさせ、(3) DNAポリメラーゼと1種類の色素標識dNTP、あるいはRNAポリメラーゼと1種類の色素標識NTP、を含む液滴を該固定された核酸分子に提供して、該プライマーの3'末端にヌクレオチドを反応させ、このとき該ポリメラーゼは反応部位と向かい合う塩基と塩基対を組むヌクレオチドを取り込み、(4) 結合した色素標識dNTPまたはNTPの存在を検出し、(5) 該結合した色素標識dNTPまたはNTPの色素分子を破壊し、(6) 色素標識dNTPまたはNTPの種類を順次変えてステップ(3)～(5)を繰り返し、該核酸分子のヌクレオチドと塩基対を形成するdNTPまたはNTPを順次結合させ、(7) 該結合されたdNTPまたはNTPの種類に基づいて該核酸分子の塩基配列を決定することを含む方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003207]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県豊田市トヨタ町1番地

氏 名 トヨタ自動車株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[598014814]

1. 変更年月日 1997年12月16日

[変更理由] 新規登録

住 所 名古屋市西区則武新町四丁目1番35号

氏 名 株式会社コンボン研究所